

REVISIÓN DE LOS PRINCIPALES MÉTODOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ANIMALES PROCESADAS EN ALIMENTOS BALANCEADOS

REVIEW OF THE MAIN DETECTION AND IDENTIFICATION METHODS OF PROCESSED ANIMAL PROTEINS IN FEEDS

Sandra Bachur (Dirección General de Laboratorio y Control Técnico, Dirección de Laboratorio Animal, Coordinación de Análisis de Productos Alimenticios de Origen Animal y Conexos [APAC], Senasa)

Resumen

Las restricciones establecidas en la legislación respecto al uso de determinadas proteínas animales procesadas (PAP), empleadas en la alimentación animal, fueron introducidas para evitar el riesgo de transmisión y prevenir la aparición o diseminación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), enfermedad letal que afecta al ganado vacuno, asociada a la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob en humanos.

Los métodos de análisis utilizados en la detección de PAP, en los alimentos balanceados, deben ser lo suficientemente sensibles y capaces de detectar e identificar el origen de las partículas animales.

La microscopía clásica es el método internacionalmente utilizado, con un límite de detección menor al 0,1 %, capaz de discriminar los materiales prohibidos de los permitidos. Sin embargo, presenta dificultades para identificar el origen animal específico de las partículas detectadas.

Métodos complementarios a la microscopía, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), enzimoimmunoanálisis (ELISA) y espectroscopia del infrarrojo acoplado al microscopio (NIRM), entre otros, pueden brindar información adicional respecto al origen de las especies con un bajo límite de detección, permitiendo así el control especie-específico y evitando el reciclado intraespecie.

El objetivo de este artículo es presentar el avance en el desarrollo de las principales técnicas utilizadas en la detección e identificación de proteínas animales procesadas en los alimentos balanceados.

Palabras clave: encefalopatía espongiforme bovina (EEB), proteínas animales procesadas (PAP), identificación de especies, microscopía, PCR, NIRM, ELISA.

Abstract

The regulation sets out the restrictions on certain processed animal proteins (PAP's) used in animal feed which were introduced to avoid the risk of transmission, prevent the occurrence or spread of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), fatal disease that affects cattle associated with new variant Creutzfeldt - Jakob disease in humans.

Methods for the detection of PAP's should be sufficiently sensitive and capable of detecting and identifying constituents of animal origin in feed.

Classical microscopy is used internationally in detecting PAP's, with a theoretical limit of detection of less than 0.1% and is able to discriminate the permitted materials from the prohibited ones. However, this microscopic method has difficulty in identifying the species specificity of the detected particles.

Complementary methods such as polymerase chain reaction (PCR), enzyme immunoassay (ELISA) and Near Infrared Microscopy (NIRM) and a combination of these methods, can provide additional information regarding the origin of species with a low level of detection, allowing the control of species specificity, avoiding intra-species recycling.

The aim of this paper is to show the progress in the development of the main techniques used in the detection and identification of processed animal proteins in feed.

Keywords: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Processed Animal Proteins (PAP's), Species identification, Microscopy, PCR, NIRM, ELISA.

Introducción

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es una enfermedad progresiva y letal del ganado vacuno, caracterizada por la degeneración del sistema nervioso central, causada por la acumulación de una forma anormal de un prión proteico, que se deposita en determinados órganos, fundamentalmente en el cerebro.

El principal medio de transmisión se produce a partir del consumo de alimentos contaminados con el prión (Prince *et al.*, 2003), básicamente con la ingestión de harinas de carne y hueso (HCH) infectadas, utilizadas en suplementos proteicos o agregadas en forma intencional o accidental al alimento. Una de las medidas de prevención aplicadas, ya sea para evitar la aparición de la enfermedad o su propagación, fue la prohibición de alimentar al ganado con proteínas animales procesadas (PAP).

La reglamentación legal de dicha prohibición se fue adaptando y cambiando en función del avance en el conocimiento de la enfermedad y su forma de transmisión, pero principalmente con el desarrollo y la disponibilidad de nuevos métodos de análisis. En este sentido, existen dos aspectos para tener en cuenta, por un lado, con respecto a la alimentación animal, se establece que pueden ser utilizados como materia prima en la elaboración de piensos solamente materiales de animales declarados aptos para consumo humano. A su vez, se restringe o acota el uso de esas proteínas incluyendo en la legislación la prohibición de alimentar al ganado con determinadas proteínas animales. Dicha prohibición tiene distintos alcances según el país de aplicación; la Argentina prohíbe el uso de determinadas proteínas en la alimentación de rumiantes, mientras que la Unión Europea lo hizo extensivo –en un principio– a todos los animales, autorizando actualmente el uso de proteínas no rumiantes únicamente para la acuicultura.

El segundo aspecto tiene que ver directamente con el desarrollo de métodos de análisis capaces de detectar PAP en los piensos e identificar el origen específico de los estos. La técnica utilizada internacionalmente en la detección de proteínas transformadas presentes en los alimentos balanceados destinados al consumo animal es la microscopía clásica, centrada principalmente en la evaluación de las características de los fragmentos óseos. En general, este método es capaz de distinguir partículas provenientes de animales terrestres diferenciándolas de las de pescado sin dificultades (Gizzi *et al.*, 2003), pero tiene inconvenientes para diferenciar clases dentro del grupo de animales

terrestres (fragmentos óseos de origen mamífero con respecto a los fragmentos óseos de origen aviar) (Pinotti *et al.*, 2004; van Raamsdonk *et al.*, 2007, Domenis *et al.*, 2009). Este impedimento es el que llevó en un principio a la prohibición total de utilización de proteínas animales, con ciertas excepciones, para la elaboración de alimentos balanceados y trajo aparejada la exclusión de fuentes proteicas de gran valor energético en la alimentación animal.

La utilización de métodos complementarios a la microscopía, como así también la combinación de esos métodos capaces de identificar especies, como el enzimoanálisis (ELISA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la espectroscopia en el infrarrojo acoplada al microscopio (NIRM), el análisis de imágenes, el análisis proteómico, entre otros, permitiría el uso de determinadas proteínas animales, regulando el control del reciclado intraespecie.

Este artículo describe los avances realizados en las distintas metodologías utilizadas en la detección e identificación de proteínas animales procesadas, sus ventajas y desventajas.

Microscopía clásica

El monitoreo de la presencia de proteínas animales prohibidas en los piensos está basado en la microscopía clásica. Esta técnica, considerada oficial en los países de la Unión Europea y en la mayoría de los países de Latinoamérica, presenta un tiempo de análisis relativamente corto, un bajo nivel de detección (< 0,1 % HCH) y la capacidad para distinguir los componentes prohibidos (harinas de carne y hueso) de los permitidos (leche, grasa, huevo, harina de pescado, harina de pluma según la legislación de cada país).

El método se basa en la técnica de flotación diferencial. A partir de una muestra de alimento balanceado, sometida a la acción de un solvente orgánico, se obtienen dos fracciones separadas de acuerdo con la densidad de las partículas constituyentes con respecto al solvente utilizado (fracción liviana u orgánica y fracción pesada o mineral). Cada fracción obtenida es observada con distintos grados de aumento utilizando los microscopios estereoscópico y óptico.

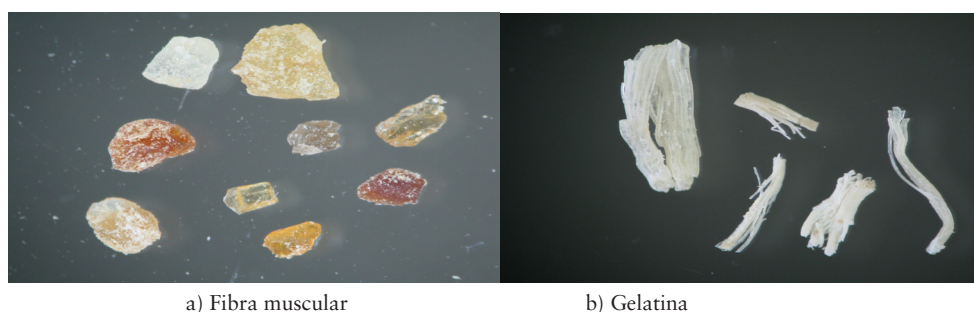
Existen numerosos trabajos científicos referidos a la optimización general del ensayo microscópico en los que se evaluaron diferentes parámetros, como peso de la muestra, tamaño de las partículas, solvente de extracción, abertura de malla del tamiz, agente de inmersión y test adicionales, entre otros.

En la actualidad se utilizan distintos protocolos de trabajo, como el Reglamento (EC) N.º 152/2009 y su modificatoria, el Reglamento (EC) N.º 51/2013, el denominado método francés y el utilizado en países de Latinoamérica, desarrollados por los propios laboratorios, presentando diferencias respecto al método europeo principalmente en el solvente utilizado para la sedimentación y la masa de la muestra.

La fracción liviana u orgánica contiene partículas cuya densidad es menor que la del solvente de extracción (fibra muscular, gelatina, pluma, pluma hidrolizada, pelo, astas, pezuña, plasma, sangre, leche) y la fracción pesada o mineral con partículas de mayor densidad (fragmentos óseos, espinas, escamas, sales, carbonatos y ceniza de hueso).

La observación sistemática de cada fracción se basa primariamente en la identificación de componentes de origen animal, diferenciándolos de los de origen vegetal y mineral. En una segunda instancia, los estudios morfológicos realizados sobre las partículas de origen animal detectadas se centran en determinar el nivel taxonómico de diferenciación de clases.

En la fracción liviana la observación de determinadas partículas (Fig. 1), como gelatina y fibra muscular, no es concluyente respecto al origen o la identidad del material; en cambio, la presencia de determinados marcadores como pluma o pluma hidrolizada, es un importante indicativo de material aviar, y los pelos, fuente de material de origen mamífero.



a) Fibra muscular

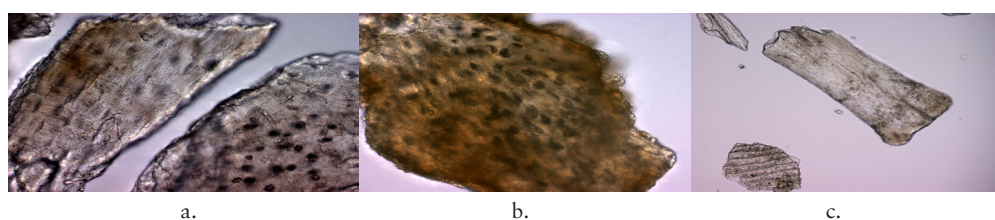
b) Gelatina

Figura 1: a) fibra muscular proveniente de harina de ave, b) gelatina proveniente de harina de carne y hueso (Microscopio estereoscópico Carl Zeiss, Stemi 2000-C, X25).

La observación de los fragmentos óseos se realiza en tres niveles de diferenciación: forma y estructura a nivel estereoscópico; y forma, tamaño y densidad de las lagunas y visibilidad de los canalículos a mayor aumento (van Raamsdonk *et al.*, 2012).

Es importante considerar el color y la dureza del fragmento óseo. El color blanco tiza a amarillento depende en gran medida de la temperatura del tratamiento térmico utilizado en la elaboración de la harina. En general, una estructura dura y opaca es indicativa de fragmentos óseos de origen mamífero siendo los de ave más quebradizos. Los fragmentos óseos de origen pesquero son más brillosos y semitransparentes (Gizzi *et al.*, 2003; van Raamsdonk *et al.*, 2012).

La observación de la estructura interna de los fragmentos óseos, es decir, las lagunas (forma y densidad) y la disposición y visibilidad de canalículos se realiza con el microscopio óptico, utilizando vaselina o glicerina como medio de montaje.



a.

b.

c.

Figura 2: Fragmentos óseos: a) obtenidos a partir de una harina de carne y hueso (se observan lagunas y canalículos); b) obtenidos a partir de una harina de vísceras de ave (se observan lagunas sin canalículos visibles); c) obtenidos a partir de una harina de pescado (se observan escamas y fragmento óseo con lagunas fusiformes). Medio de montaje: glicerol, Microscopio óptico Carl Zeiss Axiolab – X 400.

Las lagunas en los fragmentos óseos de origen pesquero, en general, son alargadas y paralelas (Fig. 2c), aunque algunas especies difieren completamente de este patrón (van Raamsdonk *et al.*, 2012).

Los fragmentos óseos terrestres presentan lagunas redondeadas a elípticas (Fig. 2a: mamífero; 2b: aviar). La diferenciación entre ambos grupos no es precisa. Estudios realizados en las lagunas de distintos tipos de huesos de pollo revelaron diferencias en la estructura interna de estas, aparecen lagunas alargadas, redondeadas o elípticas según el tipo de fragmento óseo observado (Domenis *et al.*, 2009).

La sensibilidad del método depende de la naturaleza de las partículas de origen animal halladas y es aceptado que concentraciones menores que 0,1 % HCH pueden ser detectadas en los alimentos balanceados con un mínimo porcentaje de resultados falsos negativos o falsos positivos (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Sin embargo, en alimentos adulterados al 0,1 % de HCH en presencia de 5 % de harina de pescado la sensibilidad disminuye.

La cuantificación de PAP a través de la fracción del sedimento no es recomendable por el hecho de que la fórmula utilizada presenta un factor de corrección f correspondiente a la proporción de fragmentos óseos de origen animal en la muestra, generalmente desconocido (debido a que se desconoce el tipo de harinas con la que fue elaborado el alimento) y fijado arbitrariamente.

El Reglamento (EC) N.º 51/2013 establece protocolos de observación para la detección de partículas de origen animal por microscopía, que introducen ciertos niveles de tolerancia.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) solicitó, en su informe de 2007, definir niveles de tolerancia y cantidades admisibles, teniendo en cuenta que la transmisión de BSE a través de pequeñas cantidades de productos que contienen proteínas animales contaminadas con BSE, incluso en cantidades menores que 0,1 % en alimentos para rumiantes, no puede ser desestimada.

El bajo límite de detección, el bajo porcentaje de falsos negativos y falsos positivos y la independencia del ensayo respecto al tratamiento térmico utilizado en la elaboración del alimento, constituyen ventajas que lo posicionan como método de referencia en la mayoría de los países.

Enzimoanálisis (ELISA)

Los métodos inmunológicos son técnicas analíticas basadas en la reacción específica entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo. Diferentes diseños han sido desarrollados (aglutinación, inmunofluorescencia, enzimoanálisis), pero en lo que respecta a la detección de PAP, el test de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y las tiras reactivas son las únicas técnicas utilizadas para indicar el origen de las proteínas animales contaminantes en el alimento balanceado.

En el método directo (tipo sándwich), el anticuerpo específico es fijado a la base de la celda de la placa de microtitulación. El extracto de la muestra se agrega a la celda y el antígeno de la especie de interés se une específicamente al anticuerpo de captura. El complejo antígeno-anticuerpo formado es detectado por un segundo anticuerpo biotinilado marcado enzimáticamente. La actividad enzimática es determinada por el agregado de un sustrato que en presencia de la enzima desarrolla color.

En las tiras reactivas se reúnen todos los reactivos en un soporte sólido y mediante el flujo por capilaridad de la muestra en solución se logra determinar la presencia o ausencia de la proteína específica.

Uno de los principales inconvenientes que presenta la técnica es la pérdida de sensibilidad cuando se quieren identificar proteínas que fueron sometidas previamente a un tratamiento térmico fuerte, que involucre la desnaturalización de la estructura proteica y la pérdida de los epitopes implicados en la reacción antígeno anticuerpo. Fueron investigadas distintas condiciones de proceso (temperatura, tiempo, tamaño de partícula) y su influencia en los resultados de ELISA fueron investigados. Estos estudios demuestran que la respuesta obtenida está fuertemente influenciada por la temperatura y el tiempo de exposición (Pallaroni *et al.*, 2001).

El uso de proteínas termoestables fue propuesto por distintos autores (Ansfield *et al.*, 2000 a y b; Chen *et al.*, 2002 a y b).

Ansfield *et al.* (2000) basaron su trabajo en el uso de anticuerpos policlonales derivados de proteínas termoestables obtenidas a partir de muestras tratadas térmicamente. Dichos autores desarrollaron y validaron la técnica de ELISA para detectar proteínas de rumiantes y de porcinos procesadas (provenientes del proceso de *rendering*) a partir de un alimento balanceado. Para purificar la muestra y eliminar proteínas no deseadas utilizaron dos fases de

extracción, lograron remover las proteínas derivadas del tejido animal, como la gelatina, y una gran parte de las proteínas derivadas de los componentes vegetales del alimento y concentraron en el extracto final las proteínas termoestables de interés. Además, se mejoró la sensibilidad del método incluidos doce controles negativos en la placa de corrida.

Otros autores desarrollaron ELISA basado en el uso de anticuerpos monoclonales (Chen *et al.*, 2002). La ventaja del uso de anticuerpos monoclonales es su alta especificidad, sin embargo, la sensibilidad depende de la presencia y la concentración de una única proteína blanco, cuya incorporación no está garantizada en la formulación de los alimentos balanceados que utilizan harinas de carne y hueso provenientes de restos de material cárnico (fragmentos óseos, carcasas, tejido). Por otro lado, el uso de anticuerpos policlonales provee un mayor rango de detección por no estar sujetos a un único epítipo, pero aumenta la posibilidad de reacción cruzada con otras especies presentes debido a su menor especificidad.

En la actualidad existen kits comerciales utilizados para la detección de las principales especies de interés (ovino y bovino). Estos test alcanzan una sensibilidad menor que la obtenida por microscopía y además presentan el inconveniente de que no pueden distinguir los componentes prohibidos de los permitidos, como la leche y la grasa, generando así falsos positivos. El límite de detección correspondiente a las especies bovina, porcina y aviar es < 1 %, y para la especie ovina entre 1 % y 2 %; y el kit tiene carácter cualitativo.

Una de sus principales aplicaciones es su utilización en la identificación de especies realizada directamente sobre las materias primas puras (como las harinas

de vísceras de pollo y harinas de pescado), utilizadas luego en la formulación del alimento final.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time - PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la amplificación y detección específica de fragmentos de ácido nucleico (AN) presentes en la muestra. El ensayo utiliza distintas etapas, que incluyen cambios de temperatura que desencadenan una reacción enzimática con el fin de duplicar el AN en cada ciclo. La reacción consiste en la repetición cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización del ácido nucleico (ADN: ácido desoxirribonucleico o ARN: ácido ribonucleico) presente en la muestra.
- Unión específica de los cebadores o *primers* (oligonucleótidos sintéticos) a las cadenas desnaturalizadas mediante la complementariedad de bases.
- Extensión de la cadena de ADN / ARN.

La técnica de PCR clásica involucra posteriormente un análisis electroforético de los productos de PCR (amplicones) con resultados cualitativos. En cambio la técnica del Real Time, que incorpora la utilización de compuestos fluorescentes (agentes intercalantes o sondas fluorescentes), proporciona en tiempo real un resultado numérico (Ct: *threshold cycle*) que permite la cuantificación. El parámetro Ct es definido como el número de ciclos para el cual la fluorescencia supera un determinado umbral (Fig.3). Un alto valor de Ct corresponde a una baja concentración inicial de amplicón blanco y viceversa.

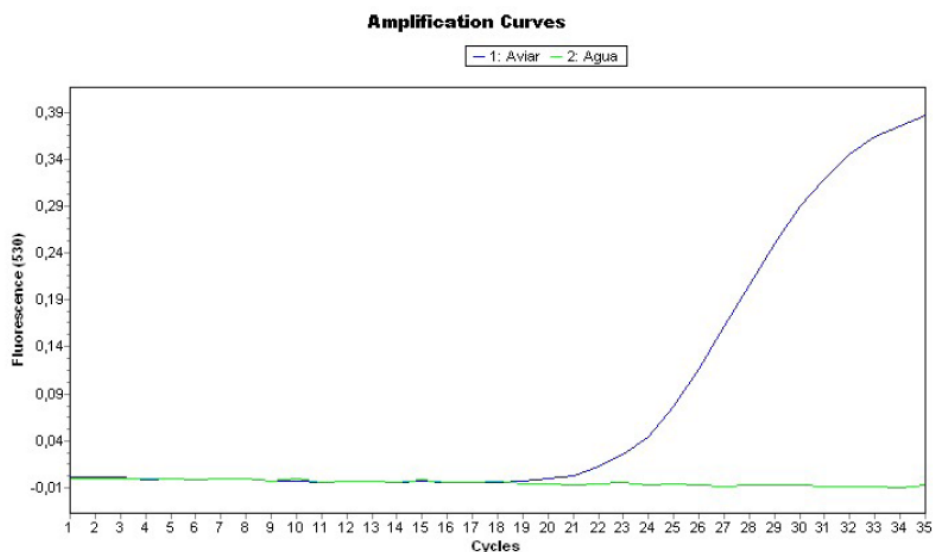


Figura 3. Curva de amplificación para la especie aviar. Secuencia de primers correspondiente a una región del Cyt b Sonda Taqman (reporter. TET – quencher: TAMRA). Ct: 22 (Termociclador: Light Cycler 2.0 Roche).

La utilización de la técnica propuesta para determinar el origen de las especies de interés en un alimento balanceado involucra distintos puntos clave a la hora de diseñar y optimizar el método.

Muchos trabajos sobre diferenciación genética de especies animales se basan en el análisis del genoma mitocondrial (Lahiff *et al.*, 2002; Fumière *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 1995; Dooley *et al.*, 2004; Frezza *et al.*, 2008). A diferencia del genoma nuclear, cada mitocondria posee miles de copias y mayor tasa de variabilidad genética, lo que representa una ventaja para la diferenciación inter-especie (Meyer *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1996). Sin embargo otros autores proponen la utilización de genes nucleares presentes en abundante cantidad en el núcleo, como los elementos nucleares dispersos cortos [SINE] (Mendoza Romero *et al.*, 2004; Aarts *et al.*, 2006).

Las condiciones extremas utilizadas durante el proceso de *rendering* para la elaboración de las harinas animales (tratamiento con ácidos o bases, temperatura y presión) afectan la integridad del ADN,

degradándolo en fragmentos de pequeño tamaño sin afectar la secuencia de bases (Chiappini *et al.*, 2005), ejerciendo la variable Presión un mayor efecto sobre la fragmentación. Como consecuencia de esto se produce una reducción en la disponibilidad del ADN, una menor eficiencia en la extracción cuando se utilizan técnicas de precipitación y se compromete la especificidad, provocando amplificación cruzada con otras especies (Hird *et al.*, 2006). La secuencia blanco a amplificar debe ser lo suficientemente pequeña, aproximadamente menor que 150pb, asegurando un tamaño menor que el ADN presente en la muestra luego del tratamiento térmico utilizado (Fumière *et al.*, 2006).

La especificidad puede ser establecida para la amplificación de fragmentos de ADN conservados a un determinado nivel taxonómico, como rumiantes o mamíferos (Mendoza-Romero *et al.*, 2004; Chiappini *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2007) o para la detección especie-específica, generalmente bovina, ovina, aviar, porcina, dentro de las especies de interés (Dooley *et al.*, 2004; Aarts *et al.*, 2006; Lahiff *et al.*, 2002).

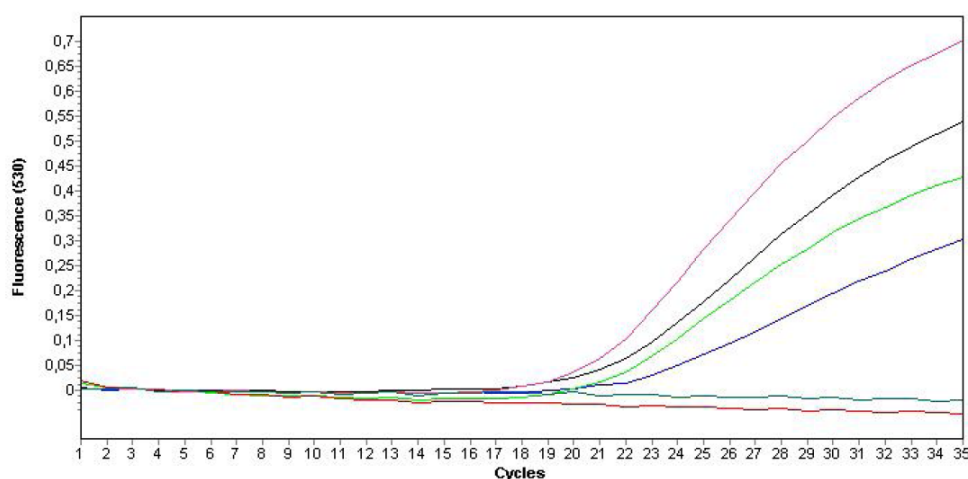


Figura 4. Curvas de amplificación de especie aviar y blanco de reactivo para distintas muestras en condiciones óptimas de corrida (Termociclador: Light Cycler 2.0 Roche).

Deben ser evaluadas las concentraciones óptimas de *primers* y sondas para el desarrollo del ensayo, la óptima es la que proporciona el Ct más bajo para una cantidad determinada de secuencia blanco. Se pueden utilizar también diseños experimentales y análisis de superficie de respuesta (RSM) para optimizar otras variables como el volumen de muestra, la temperatura de *annealing*, la concentración de cloruro de magnesio, etcétera. (Fig. 4) (Vázquez *et al.*, 2013).

Diversos estudios determinaron la capacidad del Real Time - PCR para detectar el 0,1 % de HCH en alimentos balanceados (Aarts *et al.*, 2006; Fumière *et al.*, 2006; Prado *et al.*, 2007). Sin embargo, una limitación importante de la técnica de PCR es su imposibilidad para diferenciar si el ADN animal (referido a una especie o grupo de especies) proviene de un material declarado como prohibido o no. Algunos ingredientes permitidos como la leche, grasa, proteínas hidrolizadas pueden contener DNA blanco, generando esto un falso positivo.

El laboratorio de referencia de la Unión Europea para las proteínas animales en los piensos transfirió un método de PCR validado para la detección de proteínas rumiantes (EURL-AP 2013). La secuencia de ADN nuclear de

85/86 pares de bases es amplificada usando dos *primers* específicos. Los productos de PCR son medidos en cada ciclo por medio de una sonda fluorescente. Los valores de Ct obtenidos son comparados con el valor de *cut-off* predeterminado (el valor de *cut-off* es un valor de Ct umbral que determina cuando un resultado puede ser considerado positivo o negativo). La especificidad fue testeada experimentalmente contra cinco especies de origen rumiante (vacuno: *Bos taurus*; ovino: *Ovis aries*; cabra: *Capra hircus*; ciervo: *Cervus elaphus* y corzo: *Capreolus capreolus*) con resultado positivo y contra 41 especies de diferentes orígenes con resultado negativo (mamíferos terrestres y marinos, aves, peces y vegetales). El límite de detección del método es menor que 0,1 % p/p de PAP rumiante en el alimento.

Espectroscopia en el infrarrojo acoplado al microscopio (NIRM)

El objetivo del método es determinar el origen de las partículas animales presentes en el alimento balanceado, utilizando la espectroscopia en el infrarrojo por transformada de Fourier combinada con la captación de partículas a través de un microscopio.

La técnica consiste en:

1. La obtención de los espectros individuales de cientos de partículas de origen conocido, que representen la variabilidad natural de los ingredientes animales y vegetales utilizados en la elaboración de los alimentos balanceados, conformando una biblioteca espectral de referencia, que es utilizada en la calibración del método.
2. El desarrollo de modelos matemáticos capaces de discernir el origen de las partículas.
3. La validación de dichos modelos.

El origen de las partículas presentes en la muestra de interés es identificado por comparación de los espectros individuales con la biblioteca espectral de referencia utilizando el modelo matemático propuesto.

El material de trabajo (de tamaño homogéneo y pequeño, aproximadamente 50µm) es diseminado sobre la platina del NIRM. El microscopio permite visualizar la muestra e identificar las partículas de interés. Los espectros individuales son recogidos en la zona del infrarrojo (7000-1000 cm⁻¹ del espectro electromagnético (Figs. 5).

Figuras. 5. Gráficos de Absorbancia versus número de onda de distintas partículas obtenidas a partir de un equipo NIRM Termo Fisher Scientific, Nicolet iN10.

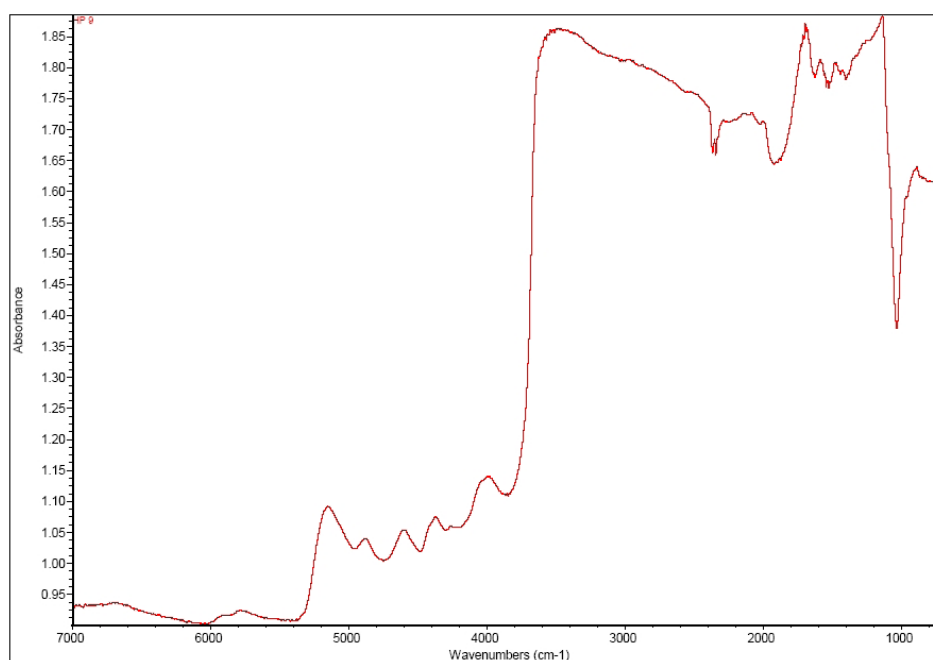


Figura 5 a) Fragmento óseo origen pesquero.

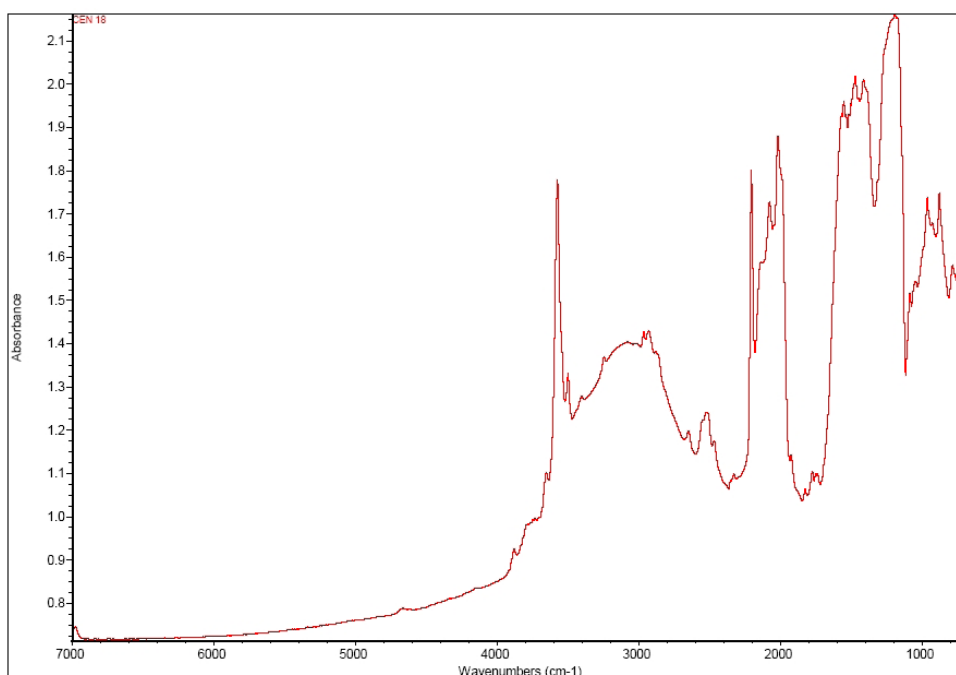


Figura 5 b) ceniza de hueso.

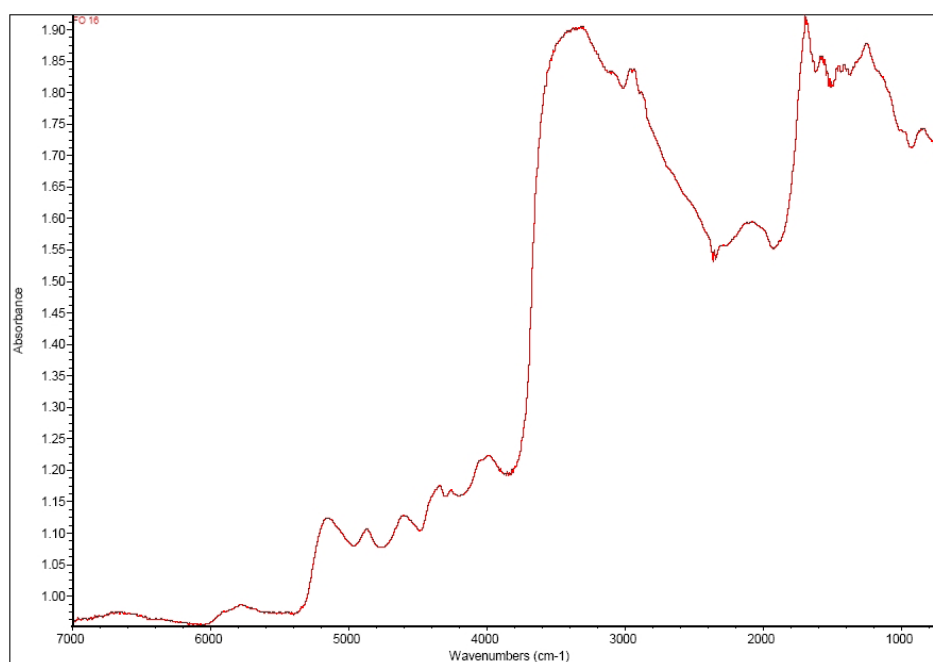


Figura 5 c) Fragmento óseo de harina de carne y hueso.

Las bandas características, cuya absorción puede ser asociada a un compuesto específico, son utilizadas en la discriminación entre especies animales. Los espectros de las partículas provenientes del análisis de un alimento balanceado se encuentran influenciados principalmente por el tipo de proteínas, lípidos, azúcares y el contenido de agua del material (Baeten *et al.*, 2005b). La mayor parte de las bandas relevantes que permiten observar diferencias entre las clases mamífera/aviar y de origen terrestre o pescado están caracterizadas por la absorción del grupo amino de las proteínas y de los ácidos grasos de los lípidos (Fernández Pierna *et al.*, 2012).

El tratamiento de la muestra, la utilización de herramientas quimiométricas, la selección de marcadores para la discriminación del origen de las especies son puntos clave en la optimización del método.

Diversos trabajos proponen utilizar la muestra sin tratamiento previo (De la Roza *et al.*, 2007; Fernández Ibáñez *et al.*, 2009), evitando la extracción con un solvente orgánico y minimizando la contaminación ambiental. En este caso, la detección está basada en la presencia de diferentes clases de partículas animales (fragmentos óseos, sangre, fibra muscular).

Por otro lado, otros investigadores proponen utilizar un protocolo de extracción con solvente orgánico siguiendo los pasos de la microscopía clásica (Baeten *et al.*, 2003; Baeten *et al.*, 2005 b; de la Haba *et al.*, 2007; von Holst *et al.*, 2008). En el análisis realizado sobre la fracción del sedimento la detección está basada exclusivamente en la presencia de fragmentos óseos / espinas.

Para el tratamiento de los datos se pueden utilizar distintas herramientas quimiométricas, como los métodos de análisis multivariantes (análisis de componentes principales [PCA], mínimos cuadrados parciales [PLS], análisis discriminante lineal [LDA] entre otros). Otra estrategia para discriminar el origen de las partículas es el uso de una regla de decisión basada en los valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda (Baeten *et al.*, 2005a; von Holst *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2010).

La determinación del límite de detección está fuertemente influida por la homogeneidad de la muestra y el número de partículas analizadas (Baeten *et al.*, 2005 a y b). La fracción del sedimento puede ser usada para la detección de niveles bajos de contaminación de HCH.

La cuantificación de PAP, utilizando el NIRM, también puede realizarse sobre la muestra total o la fracción del sedimento. La utilización de la fracción de sedimento presenta los mismos problemas que los enunciados para la microscopía óptica (Baeten *et al.*, 2005 a; Abbas *et al.*, 2010).

La técnica es objetiva, sensible y selectiva para detectar PAP en alimentos balanceados, sin embargo, hasta el momento solo puede dar una indicación del origen de las partículas detectadas (Fumière *et al.*, 2009). La principal ventaja con respecto a la microscopía clásica es que puede ser automatizada y no requiere experiencia del analista.

Combinación NIRM – PCR

La propiedad del NIRM de ser un método no destructivo permite aislar las partículas de interés y

aplicar técnicas adicionales como el Real Time – PCR para determinar sus orígenes.

Las partículas identificadas por el análisis del NIRM y clasificadas a través de los modelos discriminantes como de origen animal son separadas para el ensayo por PCR.

Protocolos especiales que incluyen la limpieza de la partícula para remover trazas inespecíficas de ADN, su extracción y análisis fueron desarrollados por Fumière *et al.* (2010).

Análisis de imágenes

El análisis de imágenes por computadora, combinado con el ensayo microscópico, puede ser utilizado para discriminar el origen de los fragmentos óseos presentes en el alimento. A través de una cámara digital y un software analizador de imágenes se obtienen las imágenes correspondientes a las lagunas de interés, sobre las cuales se pueden realizar diferentes mediciones. La técnica introduce la utilización de marcadores o parámetros de las lagunas y los canalículos. Mediante el análisis estadístico se determinan los parámetros que pueden explicar la variabilidad de los datos.

Los primeros estudios utilizaron 29 parámetros geométricos relacionados a las lagunas y 3 parámetros relativos a los canalículos, determinando que a través del área de las lagunas y su perímetro se puede discriminar entre las clases mamífera y aviar (93,3 %). Sin embargo existe un porcentaje de lagunas incorrectamente clasificadas producido por un *overlap* existente para los marcadores relevantes (Pinotti *et al.*, 2004 y 2007).

La utilización de esta herramienta requiere la incorporación de un gran número de datos para encontrar el mejor parámetro que defina el origen del material, como así también determinar el método estadístico que respalde este enfoque.

Análisis proteómico

La identificación y la secuenciación de proteínas a través de técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas permiten la identificación de las especies a partir de la caracterización de secuencias de aminoácidos de proteínas especie-específicas.

Según Reece *et al.* (2012), las posibles proteínas blanco involucradas en la identificación de especies animales

en un alimento balanceado son el colágeno, a partir de las proteínas presentes en el hueso, y la troponina I y la miosina, a partir de la fibra muscular.

Una de las desventajas que presenta el análisis proteómico radica en las modificaciones que sufren las proteínas *in vivo* (que dependen de la dieta, la edad) o *post mortem* (debidas al proceso de proteólisis como así también a la exposición a temperaturas elevadas en el proceso de *rendering*).

Esta técnica tiene la capacidad potencial de identificar en forma inequívoca el material, ya que proporciona información sobre su estructura molecular.

Conclusión

La reincorporación de determinadas proteínas animales en alimentos para rumiantes y no rumiantes solo es posible con la aplicación de técnicas analíticas capaces de discriminar el origen específico de los constituyentes animales, con el fin de evitar el reciclado intraespecie. Los métodos propuestos para la detección de PAP deben cumplir con dos premisas: el límite de detección debe ser menor que 0,1 % (EFSA 2011) y deben presentar una baja tasa de falsos positivos y falsos negativos (< 5 %).

El método microscópico, utilizado internacionalmente para el control de las harinas de carne y hueso en los alimentos balanceados, involucra la identificación de especies animales a través del análisis de los tejidos constituyentes, particularmente los fragmentos óseos, sobre la base de sus características morfológicas. A pesar de que este método no permite el reconocimiento especie-específico del material limitando la identificación a la clase animal, en la práctica es un método robusto, rápido y capaz de detectar contaminaciones del 0,01 %.

La tecnología NIRM presenta la ventaja de ser una técnica objetiva y en combinación con otras técnicas puede lograr la identificación específica del material.

ELISA es un método de *screening* rápido, con el que pueden analizarse gran cantidad de muestras al mismo tiempo. Sin embargo, tiene un límite de detección de entre 1 % y 2 %, según la especie a identificar, y también presenta la desventaja de no poder discriminar entre productos prohibidos y permitidos.

La técnica de *Real Time* PCR puede utilizarse para la detección de una especie o de un grupo de especies (rumiantes). El método transferido por la Unión Europea presenta un límite de detección menor que

0,1 %. Sin embargo, esta técnica presenta el mismo inconveniente que ELISA en cuanto a la discriminación entre materiales autorizados y prohibidos.

Hasta el momento ninguna técnica por sí sola es capaz de cumplir con los requisitos necesarios (bajo límite de detección e identificación específica) para autorizar el uso de todas las proteínas animales. La combinación de las diferentes técnicas y el desarrollo de metodologías alternativas posibilitarían la incorporación de determinadas fuentes proteicas en la alimentación animal, permitiendo el control especie-específico y evitando el reciclado intraespecie.

Agradecimiento

Al Lic. Héctor Mugica, M.V. Susana Binotti y Dr. Marcelo Bello por su valiosa colaboración, soporte técnico y revisión del presente trabajo.

Bibliografía

- Ansfield, M.; Readney, S. y R. Jackman (2000a), "Production of a Sensitive Immunoassay for Detection of Ruminant and Porcine Proteins, Heated to > 130 °C at 2.7 bar, in Compound Animal Feedstuffs", *Food and Agricultural Immunology* Vol. 12, pp. 273-284.
- Ansfield, M.; Readney, S. y R. Jackman (2000b), "Performance Assessment and Validation of a Sensitive Immunoassay for Detection of Ruminant and Porcine Heat Stable Proteins in Compound Animal Feedstuffs", *Food and Agricultural Immunology* Vol. 12, pp. 285-297.
- Aarts, H. y E. Bouw (2006), "Detection of Bovine Meat and Bone Meal in Animal Feed at a Level of 0,1 %", *Journal of AOAC International*, 89 (6), 2006.
- Abbas, O.; Fernandez Pierna, J.; Dardene, P. y V. Baeten (2010), "Near infrared microscopic methods for the detection and quantification of processed by-products of animal origin", *Proc. of SPIE*, Vol. 7676, 76760O, pp. 1-14.
- Baeten, V.; Michotte Renier, A.; Sinnaeve, G.; Garrido Varo, A. y P. Dardene (2003), "Analysis of the sediment fraction of feed by near-infrared microscopy (NIRM)", *Proceedings of the 11th International Conference*, NIR Publications, pp. 663-666.

- Baeten, V.; von Holst, C.; Garrido, A.; Vancutsem, J.; Renier, A. y P. Dardene (2005), "Detection of banned meat and bone meal in feedstuffs by near-infrared microscopic analysis of the dense sediment fraction", *Anal. Bioanal. Chem.* 382, pp. 149-157.
- Baeten, V.; von Holst, C.; Fissiaux, I.; Michotte Renier, A.; Murray, I. y P. Dardenne (2005b), "The near infrared microscopic (NIRM) method: a combination of the advantages of optical microscopy and near-infrared spectroscopy (WPS)", *Strategies and methods to detect and quantify mammalian tissues in feedingstuffs*, European Project, STRATFEED (G6RD – 2000-CT-00414), pp. 1-14.
- Chen, F. y P. Hsieh (2002a), "Porcine troponin I: a thermostable species marker protein", *Meat Science* N.º 61, pp. 55-60.
- Chen, F.; Hsieh, P. y R. Bridgman (2002 b), "Monoclonal antibodies against troponin I for the detection of rendered muscle tissue in animal feedstuffs", *Meat Science* N. 62, pp. 405-412.
- Chiappini, B.; Brambilla, G.; Agrimi, U. y G. Vaccari (2005), "Real Time Polymerase Chain Reaction Approach for Quantitation of Ruminant-Specific DNA to Indicate a Correlation Between DNA Amount and Meat and Bone Meal Heat Treatments", *Journal of AOAC International*, Vol. 88, N.º 5, pp. 1399-1403.
- Comisión Europea (2009) Regulación (EC) N.º 152/2009 de 27 de enero de 2009, Métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos.
- Comisión Europea (2013) Reglamento (UE) N.º 51/2013 de 16 de enero de 2013, Modificación del Reglamento (CE) N.º 152/2009 de métodos de análisis para la determinación de componentes de origen animal con fines de control oficial de piensos.
- De la Roza Delgado, B.; Soldado, A.; Martínez Fernandez, A.; Vicente, F.; Garrido Varo, A.; Pérez Marín, D.; de la Haba, M. y J. Guerrero Ginel (2007), "Application of near infrared microscopy (NIRM) for the detection of meat and bone meals in animal feeds: A tool for food and feed safety", *Food Chemistry* 105, pp. 1164-1170.
- De la Haba, M.; Fernández Pierna, J.; Fumiere, O.; Garrido-Varo, A.; Guerrero, J.; Pérez Marín, D.; Dardenne, P. y V. Baeten (2007), "Discrimination of fish bones from other animal bones in the sedimented fraction of compound feeds by near infrared microscopy", *J. Near Infrared Spectrosc* 15, pp. 81-88.
- Domenis, L.; Squadrone, S.; Marchis, D. y M. Abete (2009), "Osteocytelacunae features in different chicken bones", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13 (S), pp. 29-32.
- Dooley, J.; Paine, K.; Garret, S. y H. Brown (2004), "Detection of meat species using Taqman real Time PCR assays", *Meat Science* 68, pp. 431-438.
- EFSA (2007), Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Parliament on Certain Aspects related to the Feeding of Animal Proteins to Farm Animals, *The EFSA Journal* (2007), 576, pp. 1-41.
- EFSA 2011, Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the revision of the quantitative risk assessment (QRA) of the BSE risk posed by processed animal proteins (PAP's), *The EFSA Journal* (2011), 9 (1), 1947.
- EURL-AP 2013. EURL-AP Standard Operating Procedure. Detection of ruminant DNA in feed using real time PCR [en línea]. Disponible en: <<http://eurl.craw.eu>>.
- Fernández Ibañez, V.; Fearn, T.; Soldado, A. y B. de la Roza-Delgado (2009), "Spectral library validation to identify ingredients of compound feedingstuffs by near infrared reflectance microscopy", *Talanta*, 80, pp. 54-60.
- Fernández Pierna, J.; Baeten, V.; Boix, A.; von Holst, C.; Pérez Marín, D. y A. Garrido Varo (2012), "Near Infrared microscopy (NIRM), (2012), Jorgensen J., Baeten V., "Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs", *Les éditions namuroises*, pp. 81-91.
- Frezza, D.; Giambra, V.; Chegiani, F.; Fontana, C.; Maccabiani, G.; Losio, N.; Faggionato, E.; Chiappini, B.; Vaccari, G.; von Holst, C.; Lanni, L.; Saccares, S. y P. Ajmone-Marsan (2008), "Standard and Light Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal

- feedstuffs”, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, pp. 18-23.
- Fumière, O.; Dubois, M.; Baeten, V.; von Holst, C. y G. Berben (2006), “Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feed”, *Anal. Bioanal. Chem.* 385, pp. 1045-1054.
- Fumière, O.; Veys, P.; Boix, A.; von Holst, C.; Baeten, V. y G. Berben (2009), “Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs”, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (S), pp. 59-70.
- Fumière, O.; Marien, A.; Fernández Pierna, J.; Baeten, V. y G. Berben (2010), “Development of a real-time PCR protocol for the species origin confirmation of isolated animal particles detected by NIRM”, *Food Additives & Contaminants*, 27 (8), pp. 1118-1127.
- Gizzi, G.; van Raamsdonk, L.W.D.; Baeten, V.; Murray, I.; Berben, G.; Brambilla, G. y C. von Holst (2003), “An overview of test for animal tissues in feeds applied in response to public health concerns regarding BSE”, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 22 (1), pp. 311-331.
- Hird, H.; Chisholm, J.; Sanchez, A.; Hernandez, M.; Goodier, R.; Schneede, K.; Boltz, C. y B. Popping (2006), “Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real time polymerase chain reaction”, *Food Additives and Contaminants*, 23 (7), pp. 645-650.
- Lahiff, S.; Glennon, M.; Lyng, J.; Smith, T.; Shilton, N. y M. Maher (2002), “Real Time Polymerase Chain Reaction Detection of Bovine DNA in Meat and Bone Meal Samples”, *Journal of Food Protection* Vol. 65 N.º 7, pp. 1158-1165.
- Mendoza Romero, L.; Verkaar, E.; Savelkoul, P.; Catsburg, A.; Aarts, H.; Buntjer, J. y J. Lenstra (2004), “Real Time PCR Detection of Ruminant DNA”, *Journal of Food Protection*, Vol. 67 N.º 3, pp. 550-554.
- Meyer, A. (1993) “Evolution of mitochondrial DNA in fishes”, *Biochemistry and molecular biology of fish* Vol. 2. Chapter 1, Elsevier Science Publishers.
- Meyer, R.; Höfelein, C.; Lüthy, J. y U. Candrian (1995), “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple method for Species Identification in Food”, *Journal of AOAC International*, Vol. 78, N.º 6, pp. 1542-1551.
- Meyer, R. and U. Candrian (1996), “PCR – based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components”, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 29, pp. 1-9.
- Pallaroni, L.; Björklund, E.; von Holst, C. y W. Unglaub (2001), “Determination of rendering plant sterilization conditions using a commercially available ELISA test kit developed for detection of cooked beef”, *J. AOAC* 84 (6), pp. 1844-1890.
- Pinotti, L.; Campagnoli, A.; Tognon, G.; Cheli, F.; Dell’Orto, V. y G. Savoini (2004), “Microscopic method in processed animal proteins identification in feed: applications of image analysis”, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8 (4), pp. 249-251.
- Pinotti, L.; Campagnoli, A.; Maggioni, L.; Paltanin, C.; Cheli, F.; Dell’Orto, V. y G. Savoini (2007), “Selection of new markers for animal by-products characterization by classical microscopy”, *Ital. J. Anim. Sci.* Vol. 6 (Suppl. 1), pp. 339-341.
- Prince, M.J.; Bailey, J.A.; Barrowman, P.R.; Bishop, K.J.; Campbell, G.R. y J.M. Wood (2003), “Bovine spongiform encephalopathy”, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22 (1), pp. 37-60.
- Prado, M.; Berben, G.; Fumiere, O.; van Duijn, G.; Mensinga-Kruize, J.; Reaney, S.; Boix, A. y C. von Holst (2007), “Detection of Ruminant Meat and Bone Meals in Animal Feed by Real-Time Polymerase Chain Reaction: Result of an Interlaboratory Study”, *J. Agric. Food Chem.* 55, pp. 7495-7501.
- Reece, P.; Chassaing, H.; Collins, M.; Buckley, M.; Bremer, M. y H. Grundy (2012), “Proteomic analysis of meat and bone meal and animal feed”, en Jorgensen, J. y Baeten, V., *Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs*, Les éditions namuroises, pp. 114-124.

van Raamsdonk, L.; von Holst, C.; Baeten, V.; Berben, G.; Boix, A. y J. de Jong (2007), “New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feeds”, *Animal Feed Science and Technology* 133, pp. 63-83.

van Raamsdonk, L.; Pinotti, L.; Veys, P.; Campagnoli, A.; Paltanin, C.; Belinchón Crespo, C. y J. Jorgensen (2012), “Markers for microscopio detection”, Jorgensen J., Baeten V., “*Detection, identification and quantification of processed animal proteins in feedingstuffs*”, Les éditions namuroises, pp. 59-69.

Vázquez, N.; Bachur, S.; Bello, M. y S. Binotti (2013), “Identificación de Especies de Origen Animal en Productos Cárnicos por Real Time – PCR”; Trabajo aceptado para su publicación en Ingeniería Alimentaria [en línea]. Disponible en: <<http://www.ialimentaria.com/nota.asp?Id=3751>>.

von Holst, C.; Baeten, V.; Boix, A.; Slowikowski, B.; Fernandez Pierna, J.; Tirendi S. y P. Dardene (2008), “Transferability study of a near infrared microscopic method for the detection of banned meat and bone meal in feedingstuffs”, *Anal. Bioanal. Chem*, 392, pp. 313-317.